

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)特許公報 (B2)

(11)特許番号

第2672551号

(45)発行日 平成9年(1997)11月5日

(24)登録日 平成9年(1997)7月11日

(51) Int.Cl.
 C 12 N 15/09
 9/02
 // (C 12 N 15/09
 C 12 R 1:465)
 (C 12 N 9/02

識別記号 庁内整理番号
 9282-4B

F I
 C 12 N 15/00
 9/02

技術表示箇所
 A

請求項の数 5 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願昭63-48927
 (22)出願日 昭和63年(1988)3月2日
 (65)公開番号 特開昭64-2585
 (43)公開日 昭和64年(1989)1月6日
 (31)優先権主張番号 特願昭62-45127
 (32)優先日 昭62(1987)3月2日
 (33)優先権主張国 日本 (JP)
 微生物の受託番号 FERM BP-1140
 微生物の受託番号 FERM BP-1141
 微生物の受託番号 FERM P-9168
 微生物の受託番号 FERM P-9169
 微生物の受託番号 FERM P-9170

(73)特許権者 99999999
 三共株式会社
 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
 (72)発明者 馬目 太一
 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共
 株式会社内
 (72)発明者 保志野 恵美子
 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共
 株式会社内
 (74)代理人 弁理士 大野 彰夫
 審査官 田中 美奈子

(54)【発明の名称】チトクロームP-450遺伝子を含有するDNA

1

2

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】放線菌のチトクロームP-450遺伝子を含
 み水酸化活性を宿主に付与し得るDNA断片であって、ML
 -236Bナトリウム塩 (ML-236BNa) をCS-514へ変換す *

* る能力を有する放線菌の染色体に由来し、以下に表わさ
 れる制限酵素切断地図を有することを特徴とする約7.1k
 bのDNA断片。

(Bgl II/Mbo I)

Sp	Bc	E	X	P	Sp	M	M	P	K	Sa
0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	1.0	0.9	2.0	0.5	0.8	

0.2

【請求項2】放線菌のチトクロームP-450遺伝子を含

み水酸化活性を宿主に付与し得るDNA断片であって、ML

-236Bナトリウム塩 (ML-236BNa) をCS-514へ変換する能力を有する放線菌の染色体に由来し、以下に表わされる制限酵素切断地図を有することを特徴とする約2.9kbのDNA断片。

* 【請求項3】特許請求の範囲第1項または第2項記載のDNA断片を含むことからなる組換えプラスミド。

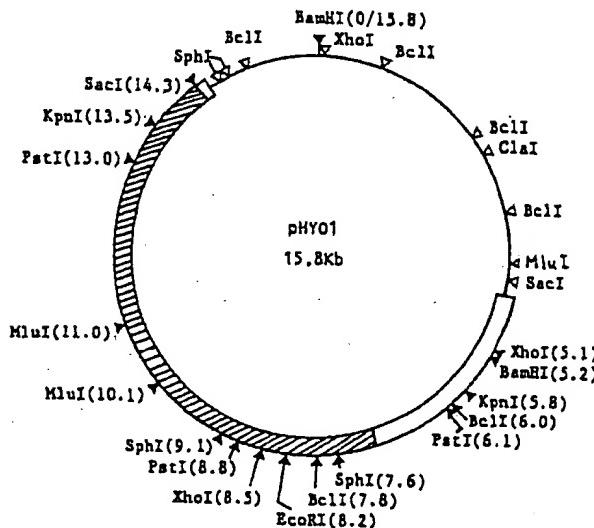
【請求項4】以下に表わされる制限酵素切断地図を有するpHY01:

(Bg 1 II / Mb o 1)

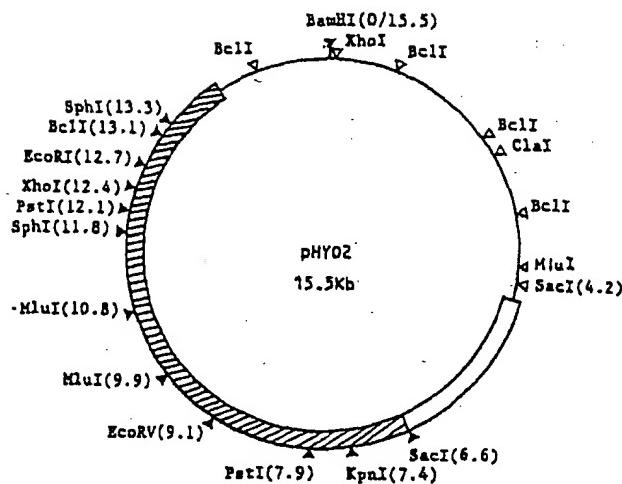
	Sp	Bc	E	X	P	Sp	M
0.2	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	1.0	

10

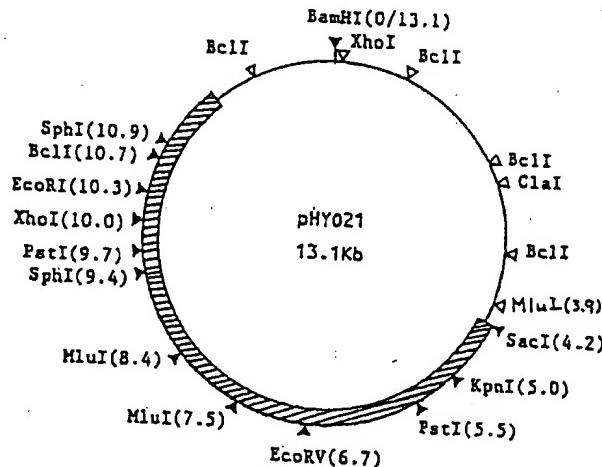
*



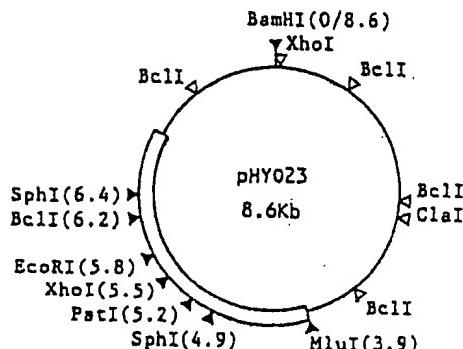
以下に表わされる制限酵素切断地図を有するpHY02:



以下に表わされる制限酵素切断地図を有するpHY021:



および以下に表わされる制限酵素切断地図を有するpHY023:



からなる群より選択される、特許請求の範囲第3項記載の組換えプラスミド。

【請求項5】 特許請求の範囲第3項または第4項記載の組換えプラスミドを保持する微生物。

40 【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明はストレプトミセス属に存在し、水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450の生成に関する遺伝子部分を含有するDNAの単離およびその利用に関する。

さらに詳しくはストレプトミセス属に存在しML-236Bナトリウム（以下、「ML-236BNa」という）を 6β -ヒドロキシ-ML-236Bナトリウム（以下、「CS-514」という）へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450を包含する蛋白質の生成に関し、制限酵素Mbo Iの部分消化によって生成され、約7.1kbからなるDNA断片中

に存在し水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含有することを特徴とするDNAに関する。

従来の技術

微生物を用いるDNA組み換え実験は特に大腸菌を中心として枯草菌、酵母において発展してきた。なかでも大腸菌のDNA組み換え実験の発展はめざましく、種々の遺伝子の解析のみならずある種の有用ペプチドの工業生産にまで応用されるに至っている。一方、放線菌は抗生物質や生理活性物質などの二次代謝産物の生産に関して多種多様な能力を有すること、あるいは微生物変換において種々機能を發揮することから、醸酵工業の分野では古くから重要視されてきている。にもかかわらず放線菌の育種の手法は限られており、この限られた手法の中で生産性向上などに成果をあげてきた。このような状況のもとで放線菌の育種改良研究の1つの手法として、DNA組み換え実験系の確立が望まれ、その手法を用いての生産性向上や新規物質の生産が期待されるようになってきた。現在、放線菌の特定菌種 (*S.coelicolor A* (3) 2, *S.lividans*など) では宿主・ベクター系が確立され種々の放線菌遺伝子がクローニングされている。それらは例えば抗生物質の生産に関する遺伝子としてのアクトノロジン生合成遺伝子 (Nature, 309, 462 (1984)), エリスロマイシン生合成遺伝子 (Bio technology, 2, 808 (1986)) などである。アクトノロジン生合成遺伝子を同類の抗生物質であるメルマイシンの生産菌ストレプトミセス・エス・ピーに導入すると新規抗生物質のメルロジンが生産されたとの報告がある (Antimicrob. Agents Chemother. 29, 13 (1986))。また放線菌の酵素遺伝子もエンドグリコシダーゼH遺伝子 (J.Biol.Chem., 256, 10640 (1981)) をはじめとしていくつかの報告がある。

発明が解決しようとする問題点

上述のごとく放線菌の遺伝子のクローニングに関する報告は増えつつあるものの、抗生物質生産、生理活性物質生産、微生物変換能など放線菌の能力の多様性を考慮するとこれらの研究ははじまつたばかりである。特に放線菌を用いての微生物変換に関する酵素の遺伝子については、工業上の重要性にも拘わらずいまだにクローニングされた例がない。従つて、放線菌の組み換えDNA技法をこのような放線菌の育種改良に用いることが望まれている。

問題点を解決する手段

本発明者らは、微生物変換に用いられるストレプトミセスの特定の酵素の産生に係る遺伝子を含むDNAを提供すべく研究した。その結果、ML-236BNaの6 β 位を水酸化しCS-514へと変換させ得る水酸化酵素遺伝子を含むDNAをストレプトミセス属に属する菌株から分離することに成功した。ML-236BNaからCS-514への水酸化活性を欠失しているか、または活性の低い例えばストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) に、該DNA

を組み込んだプラスミドを導入することにより、係る遺伝子が発現し、ML-236BNaからCS-514への変換が可能であることから該DNAを含有する組み換えプラスミドを工業生産に用いられる例えばストレプトミセス・カルボフィラスに導入することにより、その遺伝子の増幅効果によって、変換効率の良い株または単位基質 (ML-236BNa)あたりの変換時間の短い株の造成が期待できることを見出し、本発明を完成した。

本発明によれば、ML-236BNaの6 β 位を水酸化してCS-514へ変換しうる水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子に関し、該遺伝子のDNA断片を含有する組み換えプラスミドが提供される。

本発明のチトクロームP-450遺伝子を含むDNA断片は、ML-236BNaを基質とし、CS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450の遺伝子を含むものであれば、それが他の種類の基質をも水酸化するものであつてもよい。また、チトクロームP-450遺伝子を含むDNA断片の起源としては、特にその種類を問わず、ML-236BNaの6 β 位を水酸化しCS-514を生成する能力を有する放線菌の染色体DNAに由来するものが好適に用いられる。そのようなものとしては例えばストレプトミセス・フラボビレンス (*Streptomyces flavovirens*)などを挙げることが出来る。

他方、ベクタープラスミドとしては放線菌内にあつて自律増殖可能であり、かつ宿主細胞の分裂に際して安定に娘細胞に受け継がれていく安定保持性に優れたものであればよく、使用する宿主によって自由に選ぶことができる。ベクタープラスミドの具体的なものとしては例えば公知のpIJ702 (Katz et al., J.Gen.Microbiol., 129, 2703 (1983)) 等を挙げることができる。

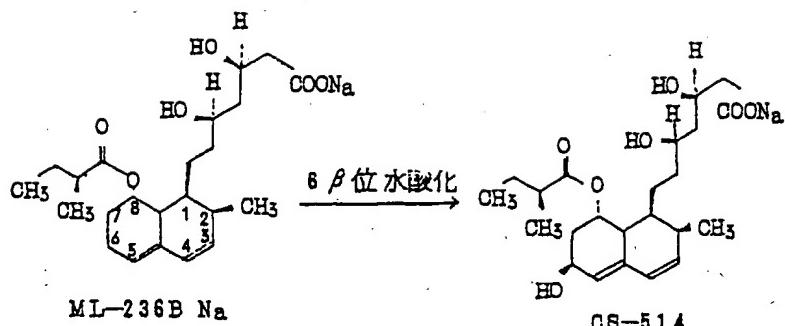
しかしながら、ベクタープラスミドは本発明のDNAを含む組み換えプラスミドを含有する形質転換体のスクリーニングに適した特定の抗生物質耐性を付与する遺伝子を有し、且つ挿入失活によって組み換えプラスミドであることが確認でき、宿主域の広いプラスミドがよい。

従つて、そのようなプラスミドとしてはチオストレプトン耐性が付与され、且つ本来pIJ702のメラニン産生遺伝子を発現できない放線菌においてもメラニン産生遺伝子を発現できるように設計され、広い宿主で用いることの可能な例えばプラスミドpMEL16, pMEL18, pMEL25 (特願昭61-193316号) が好適である。

本発明で提供するチトクロームP-450遺伝子を含むDNAはベクタープラスミドにチトクロームP-450遺伝子を含むDNAを含有したものであればよく、例えば本発明者の命名するところの後述するプラスミドpHY01や宿主菌の中でプラスミドpHY01が組み換えられた結果生じたプラスミドpHY02またはそれから誘導されるプラスミドpHY021を挙げることが出来る。

ここにML-236BNaの6 β 位を水酸化しCS-514の生成に関する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-45

○遺伝子は下図



で示されるようにML-236BNaの6 β 位の水酸化反応を触媒する水酸化酵素産生に関与するDNAをいう。

本発明のチトクロームP-450遺伝子を含むDNAを含有する組み換えプラスミドの調製はそれ自体公知の方法で行なうことが出来る(例えばD.A.Hopwoodら "Genetic manipulation of Streptomyces", a Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985)。

組み換えプラスミドの調製方法

(1) ベクタープラスミド

ベクタープラスミドとしては上述のように放線菌で安定に複製増殖を維持出来るものであれば、何でも用いることが出来るが、それらから使用目的に応じて誘導されるものも含まれる。例えばストレプトミセス・リビダンスSANK68182〔微研条寄第1141号(FERM BP-1141)〕を用いてそれ自体公知の方法(例えばD.A Hopwoodら,

“Genetic Manipulation of Streptomyces”, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985) により採取出来るプラスミド pIJ702 をベクターとして用いることが出来る。また、プラスミド pIJ702 のメラニン産生遺伝子を発現出来ない放線菌宿主でも使用出来るように調製されたプラスミド pMEL16, pMEL18, pMEL25 も同様に用いることが出来る。これらのプラスミドは選別標識 (マークー) としてチオストレプトン耐性 (以下、「Thior」という) とメラニン産生 (以下、「Mel⁺」という) が付与されており、Thio^r, Mel⁻ を示す形質転換株を選別することにより組み換えプラスミドの調製に有利に用いることが出来る。

(2) 水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含むDNAのクローニング

上述のML-236BNaの6 β 位を水酸化しCS-514に変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含む放線菌（例えばストレプトミセス・フラボビレンスなど）の菌体より染色体DNAを公知の方法、例えばMarmurの方法（J.Mol.Biol., 3, 208 (1961)）で抽出する。抽出された染色体DNAを適当な制限酵素により切断すれば、目的のチトクロームP-450遺伝子を含むDNA断片が他のDNA断片と共に得られる。このようにして得ら

れるDNA断片の混合物から目的の遺伝子を含むDNAを含有する組み換えプラスミドを調製するには、まずチトクロームP-450遺伝子を含むDNA断片の末端と結合し得るように処理されたベクタープラスミドへ該DNA断片を組み込む。次に生成された各種の組み換えプラスミドによる宿主菌の形質転換を行なつた後、例えばThior^R・MeI⁻を示す組み換えプラスミド含有形質転換体を選別する。次いで選別された形質転換体から目的の形質を発現する形質転換体を選別することにより行なうことが出来る。前述のプラスミドpMEL18をベクターとして使用する場合を1例として挙げれば、次の通りである。即ち、染色体DNAを制限酵素Mbo Iにより3~20kbのDNA断片となるよう部分分解（例えばT. Maniatisら、"Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 282頁, 1982）し、得られる該DNA断片を、Bgl IIにより切断開環したpMEL18と混合し、さらにT₄DNAリガーゼで連結処理する。これによって、染色体DNAの断片が導入された目的の組み換えプラスミドを含有する連結混合物を得る。連結混合物から目的の組み換えプラスミドを選別するには、該混合物をML-236BNaの6β位を水酸化しCS-514へ変換する能力を本来持たないかもしくは極めて低い能力しか持たない放線菌のプロトプラストに導入し、寒天平板上に塗抹する。次いで培養した寒天平板上、チオペプチドをえた軟寒天培地を重層する。重層後、該寒天平板を培養するとThior^Rを示す形質転換株が生育してくる。このなかで組み換えプラスミドを有する形質転換株はメラニンを産生しないので容易に判別可能である。次いで選別されたメラニンを産生しない形質転換株はML-236BNaを添加した寒天平板上に移植して培養し、コロニーを十分に生育させる。このコロニーをトロツカーデ打抜き寒天ブレグを作製する。このようにして作製した寒天ブレグ10個を1つの集団としてマイクロチューブに入れ、エタノール水溶液を加えよく攪拌、抽出した後、遠心分離しその上清を高速液体クロマトグラフィー（以下、「HPLC」という）に付す。次いでCS-514に由来するピークの存在の有無を判別するという一次スクリーニングに供した。

二次スクリーニングは一次スクリーニングでCS-514に由来するピークの存在が認められた集団に含まれるコロニーから夫々をチオペプチドを含む培地に接種し振盪培養する。次いでML-236BNaを添加しさらに振盪培養を継続した後、その培養液をマイクロチューブに採取し、遠心分離し上清を採取する。採取した上清をHPLCに付しML-236BNaの6β位を水酸化しCS-514に変換しているクローンを選別する。このようにCS-514を生成するクローンが本発明の水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含むDNAを含有する組み換えプラスミドを保持する。従つてこれを前述のプラスミド抽出法によって抽出すればベクタープラスミドにML-236BNaの6β位を水酸化しCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含むDNAが含有された組み換えプラスミドを取得出来る。このようにして得られた組み換えプラスミドとして例えば具体的にはプラスミドpHY01またはプラスミドpHY02を挙げることが出来る。

(3) 組み換えプラスミドの具体的説明

上述の方法によって得られる組み換えプラスミドpHY01およびプラスミドpHY02(実施例並びに第2図および第3図参照)、更にプラスミドpHY02から誘導されるプラスミドpHY021(第4図参照)について、具体的に述べる。

(I) プラスミドpHY01による水酸化酵素活性の確認

プラスミドpHY01の含有する挿入DNA断片が、ML-236BNaの6β位を水酸化してCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含むことは次のことから理解される。即ちプラスミドpHY01を含有する組み換え株からこのプラスミドを除去することによって生ずるプラスミド除去株はチオペプチド感受性となり、同時に水酸化活性の消失とCO差スペクトルによる450nm付近の吸収極大の消失を伴うことから理解される。さらに該プラスミド除去株を宿主としてプラスミドpHY01を用いて再形質転換すると得られる再形質転換株はすべてThio^rとなると共に水酸化活性の復帰およびCO差スペクトルによる450nm付近の吸収極大の復帰が認められることおよびこの再形質転換株からプラスミドpHY01が分離できることから確認される。しかしながら、このプラスミドpHY01は第2図から明らかの如く、小型化するには不都合である。小型化の研究には以下に述べるプラスミドpHY02を用いた。

(II) プラスミドpHY02の存在確認とプラスミドpHY021の誘導

プラスミドpHY01の形質転換によって、ML-236BNaをCS-514へ変換する能力を示す形質転換株の1株から分離された組み換えプラスミドは、プラスミドpHY01以外にほぼ同じ大きさのプラスミドpHY02が存在していることが判明した。即ち、プラスミドpHY01はSac I消化によって約10kbおよび約5.8kbのDNA断片を生成することがわかつているが(第2図参照)、該プラスミド混合物はSac

Iは消化によってプラスミドpHY01に由来する約10kbおよび約5.8kbのDNA断片の他にプラスミドpHY02に由来する約13.1kbおよび約2.4kbのDNA断片を生成する。そこで該プラスミド混合物を用いてストレプトミセス・リビダンスを形質転換し、Sac I消化によって約13.1kbと約2.4kbのDNA断片を生ずるプラスミドのみを含む形質転換株を分離することによってプラスミドpHY02を単独に含む形質転換株が得られる。この形質転換株はML-236BNaからCS-514へ変換する能力を有していることからプラスミドpHY02もプラスミドpHY01と同様にML-236BNaの6β位を水酸化してCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含む挿入DNA断片を持っていることになる。プラスミドpHY02は該プラスミドを単独に含む形質転換株から調製することが出来る。

第3図に示すプラスミドpHY02の制限酵素切断地図を作成することにより、該プラスミドのベクター部分に存在するSph Iサイトを含む約300bpが欠失していること、水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含む約10kbの挿入DNA断片において宿主菌体内において、少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7kbを含む約7.1kbのDNA断片が組み換えを受け、pHY01の挿入DNA断片における当該部分と相同域が逆向きに配位されたものであることが理解される。このように少なくとも約6.7kbのDNA断片が逆向きに配位されたにも拘わらずML-236BNaがCS-514への変換を受けることは、ML-236BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子が、少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7kbを含む約7.1kbのDNA断片内に位置していること、および該チトクロームP-450遺伝子のプロモーター領域も含有されていることを示唆する。

前述のごとくプラスミドpHY02において、Sac IからSph Iサイトまでの約6.7kbを含む約7.1kbのDNA断片内に水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子が含まれているということは、Sac I消化によって生ずる約2.4kbのDNA断片は水酸化酵素活性の発現には不要であることを示す。従つてこの約2.4kbのDNA断片を除去することによってプラスミドの小型化が可能であることは容易に理解される。まずプラスミドpHY02をSac Iで消化し、約13.1kbと約2.4kbのDNA断片を得、次いで加熱処理したのちT₄DNAリガーゼで連結し連結混合物を得る。次いでストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入し、前述の方法によって形質転換株を得る。さらにこれらの形質転換株は前述の二次スクリーニングと同じ方法によって培養されHPLCにてCS-514を生成するクローンを選別する。次いで選別されたクローンについて前述のプラスミド抽出法によってプラスミドを抽出取得出来る。かくして得られる具体的なものとしては第4図に示す約13.1kbから成りSac I切断サイトが1ヶ所となったプラスミドpHY021を挙げることが出来る。第4図はプラスミドpHY021の制限酵素切断地図を示すが、該プラスミ

ドはプラスミドpHY02におけるSac I消化によって生ずる約2.4kbのDNA断片に相当する領域が除去されたこと以外はプラスミドpHY02と同一であることが示される。

(III) チトクロームP-450遺伝子局在領域の決定

プラスミドpHY021の挿入DNA断片約7.1kb内にML-236B NaからCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450が位置していることはすでに述べた。次に、この約7.1kb挿入DNA断片内のどの領域にチトクロームP-450遺伝子が局在するかを検討した。その検討方法は挿入DNA断片内にある制限酵素部位を利用して行なった。即ち、pHY021をSph Iで完全に消化した後、アガロース・ゲル電気泳動すると約11.6kbと約1.5kbのDNA断片に切断されていることがわかる。この約11.6kbDNA断片を含むゲルを切出し、電気溶出法によって該DNA断片を得、これをT₄DNAリガーゼで連結処理した後、ストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入する。

かくして得られた形質転換株はプラスミドpHY021の約7.1kb挿入DNA断片から約1.5kbのSph I断片を欠失した約5.6kbの挿入DNA断片を含む約11.6kbのプラスミドpHY022を含有している。またプラスミドpHY021をMlu Iで完全に消化した試料をアガロース・ゲル電気泳動すると約8.6kb、約3.6kb（ベクターDNA断片の約0.3kbを含む）および約0.9kbのDNA断片に切断されていることがわかる。このなかの約8.6kbのDNA断片を含むゲルを切出し、電気泳動法によって該DNA断片を得、これをT₄DNAリガーゼで連結処理した後、ストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入する。かくして得られた形質転換株はpHY021の約7.1kbの挿入DNA断片からMlu I消化によって生ずる約4.2kbのDNA断片を欠失した約2.9kbの挿入DNA断片を含む約8.6kbのプラスミドpHY023を含有している。

次に、これらのプラスミドpHY022およびプラスミドpHY023を含有する形質転換株について前述の二次スクリーニングと同じ方法によって培養されHPLCにてCS-514の生成量を調べると同時に、菌体を超音波破碎したのち遠心分離して得られる無細胞抽出液についてOhmuraらの方法（J.Biol.Chem., 239, 2370, 1964）に従い、還元型CO差スペクトルによりチトクロームP-450の有無を判定した。

第7図はその結果を示すがチトクロームP-450遺伝子はpHY023の挿入DNA断片約2.9kb内に局在することが示される。また、ML-236B NaからCS-514への十分な変換活性を宿主ストレプトミセス・リビダンスに与えるためには約7.1kbの全域が必要であることが示される。

なお、本発明において使用される放線菌の詳細な説明は次の通りである。

1. ストレプトミセス・フラボビレンスSANK63684（微生物研寄第9170号）

本発明に用いたML-236B NaからCS-514への変換能を有するストレプトミセス・フラボビレンスSANK63684の

形態的諸性質及び生理的諸性質は次の通りである。なお各種寒天培地の調製、種培養、本培養及び結果の観察はISP基準、応用微生物工業審査基準、ワックスマンの勧告などに従った。各種培地上の生育色調は「色の基準」（日本色彩研究所版）に従った。

1) 形態学的特徴

形態学的特徴は光学顕微鏡観察のほか、下記の要領で調製したサンプルを用いた電子顕微鏡観察も行った。

菌株の固定には2%オスミウム酸を用い、室温下約10時間蒸気固定した。固定サンプルを寒天培地のまま、50,70,80,90,95,100%の各濃度のエタノールで15分間脱水し、媒介液酢酸イソアミルで置換した。乾燥は、臨界点乾燥装置HCP-1を使用し、液体炭酸を移行液として用いた臨界点乾燥を行った。乾燥サンプルにはイオンコーターIB-3型を用い、金の膜の厚さが約200Åになる様に蒸着した。観察は走査電子顕微鏡MSM-4型（日立明石）によった。この時の加速電圧は25kVである。

表1 形態的特徴(28°C, 10日間観察)

胞子柄形態	直状～曲状
胞子表面	平滑
胞子連鎖数	50個以上
気菌子分枝	単純分枝
特殊器官	なし

2. 各種培地上の培養性状

表2(28°C, 14日目観察)

イースト・麦芽寒天 (ISP2)	G	非常に良好 薄オリーブ (6-7-11)
	AM	豊富 オリーブ灰～灰(2-7-11～N-7)
	R	オリーブ灰(2-4-10)
	SP	なし
オートミール寒天 (ISP3)	G	非常に良好 明るいオリーブ(6-5-11)
	AM	豊富 オリーブ灰～灰(2-7-11～N-7)
	R	オリーブ(4-4-11)
	SP	なし
スター・無機塩寒天 (ISP4)	G	良好 明るいオリーブ灰 (4-8-11)
	AM	豊富 オリーブ灰～灰(2-7-11～N-7)
	R	明るいオリーブ灰(4-6-11)
	SP	なし
グリセリン・アスパラ ギン寒天 (ISP5)	G	あまり良くない オリーブ 黄(8-8-11)
	AM	やや少い 灰(N-7)
	R	薄オリーブ(8-7-11)

- 3: チロシン寒天(ISP7)
4: イースト・麦芽エキス寒天
(ISP2)

	SP	なし
ペプトン・イーストエキス・鉄寒天 (ISP6)	G	良好 明るい茶味灰(1-8-10)
	AM	良好 灰味白(N-9)
	R	薄黄味茶(6-7-8)
	SP	なし
チロシン寒天 (ISP7)	G	良好 明るいオリーブ(6-5-11)
	AM	良好 黄味灰～灰(2-9-12～N-7)
	R	明るいオリーブ(6-5-11)
	SP	なし
ショクロース・硝酸塩寒天	G	あまり良くない 色なし
	AM	やや少い 明るい茶味灰(1-7-6)
	R	明るいオリーブ灰(4-7-11)
	SP	なし
グルコース・アスパラギン寒天	G	あまり良くない 薄黄(6-9-11)
	AM	やや少い 黄味灰～灰(2-9-11～N-7)
	R	薄黄～オリーブ灰(6-9-11～3-7-12)
	SP	なし
栄養寒天 (Difco)	G	あまり良くない 明るいオリーブ灰(2-8-11)
	AM	良好 灰味白(N-8)
	R	オリーブ灰(3-7-10)
	SP	なし

G: 生育 AM: 気菌糸 R: 裏面 SP: 可溶性色素

3. 生理的性質

表 3

スターチの加水分解	陽性
ゼラチンの液化	〃
ミルクの凝固 26°C	陰性
37°C	陽性
ミルクのペプトン化 26°C	〃
37°C	〃
硝酸塩還元	〃
メラニン様色素生産性(培地1)*	陰性
(培地2)	〃
(培地3)	〃
生育温度範囲(培地4)	15～40°C
食塩耐性(培地4)	7%

* 培地1: トリプトン・イーストエキスプロス(ISP1)
2: ペプトン・イーストエキス・鉄寒天(ISP6)

4. 炭素源の資化性

表 4

D-グルコース	+
L-アラビノース	+
D-キシロース	+
イノシトール	-
ラフィノース	-
D-マンニトール	+
D-フルクトース	±
L-ラムノース	+
ショクロース	-

+: 良く資化する

±: 資化する

-: 資化しない

5. 細胞壁化学組成

20 Beckerらの方法 (Appl. Microbiol. 12, 236, 1965) に依る分析の結果、細胞壁主要構成物質としてLL-ジアミノピメリン酸およびグリシンを検出した。細胞壁型はI型である。

以上の結果を要約すると、SANK63684は直状～曲状の胞子柄を示し、その先端に50個以上の胞子連鎖を形成する。胞子表面は平滑である。基生菌糸は薄オリーブ～オリーブ黄～明るい茶味灰の生育をし、灰味白～オリーブ灰～灰色の気菌糸を着生する。気菌糸は粉状であり培養後期に湿潤化 (hygroscopic) に伴う黒い斑点が見られる場合もある。また、可溶性色素およびメラニン様色素は産生しない。細胞壁型はLL-DAPとグリシンを含むI型である。

これらの諸性状から、SANK63684はストレプトミセス属に属することは明らかである。既知ストレプトミセス属の中でも特に近縁の種としてストレプトミセス・フラボビレンスが挙げられる。そこで、ストレプトミセス・フラボビレンスISP5062株と本菌株の同時比較培養を行った。その結果、両菌株間には形態的諸性状および生理的諸性質において、ほとんど差異は認められなかった。

40 従って、SANK63684はストレプトミセス・フラボビレンスと同一種と考えられ、本菌株をストレプトミセス・フラボビレンスSANK63684と同定した。

2. ストレプトミセス・リビダンスSANK68182 [微研条寄第1141号 (FERM BP-1141)]

E. Katzによって構築されたプラスミドpIJ702を保持するストレプトミセス・リビダンス3131である (J. Gen. Microbiol. 129, 2703～2714, 1983)。

3. ストレプトミセス・リビダンスSANK63086 (微研菌寄第9169号)

50 ストレプトミセス・リビダンスTK21である。本菌株は

"Genetic Manipulation of Streptomyces", A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985に記載されており、放線菌の宿主として世界中で用いられている。

4. ストレプトミセス・リビダンスSANK60587 (微研菌寄第9168号)

本発明者らによって構築されたプラスミドpMEL18 (特開昭62-122585, J. Antibiotics, 40, 1440~1447, 1987) を保持するストレプトミセス・リビダンスTK21株である。

5. ストレプトミセス・ジーモンジネンシス [16] - 8 · SANK61185 [微研条寄第1140号 (FERM BP-114 0)]

本菌株の形態学的諸性質及び生理的諸性質については特開昭62-122585号公報において詳細に述べている。

実施例1. 組み換えプラスミドの調製法と形質転換

ストレプトミセス・フラボビレンスSANK63684 (微研菌寄第9170号) をGGCV液体培地 (0.4%グリセロール, 0.1%グリシン, 0.4%カザミノ酸, 0.1%硫酸マグネシウム, 0.01%塩化カルシウム, 0.1%酵母エキス, 微量金属塩溶液4ml/l) に接種し、28°Cで3日間振盪培養した。これを種とし、新鮮なGGCV培地100mlの入った500ml溶坂口フラスコに5%量接種し28°Cで24時間往復振盪機で培養した。この培養液から低速遠心で菌糸体を得、この菌糸体からMarmurの方法 (J. Mol. Biol., 3, 208, (1961)) に準じて全DNAを抽出、精製し、DNA溶解用緩衝液 (10mM Tris (pH7.5), 10mM NaCl, 1mM EDTA) で透析して供与体DNAとした。

このようにして得られた供与体DNA 5 μg を、1uのMbo Iを用いて37°Cで反応させ、3~20kbのDNA断片になるよう部分分解した。この反応液は70°Cで10分間処理することによってMbo Iを加熱失活させた。次いで25倍容量の-20°Cのエタノールを加え-70°Cで30分間放置後、15,000rpmで3分間遠心してDNAを沈殿させた。

他方、ベスター・プラスミドpMEL18 (参考例参照。本プラスミドはストレプトミセス・リビダンスSANK60587 (微研菌寄第9168号) からD.A. Hopwoodら "Genetic Manipulation of Streptomyces", A Laboratory Manual, The John Innes Foundation (1985) に記載の方法によつて採取される。) の1 μgを5uのBgl IIによって37°C、2時間反応させ完全に切断した。このBgl IIで切断されたpMEL18は70°Cで10分間加熱してBgl IIを失活させた後、前述と同じくエタノール沈殿させた。

以上のようにして調製したMbo Iで部分分解した供与体DNAとBgl IIで完全切断したpMEL18とを、35 μlの蒸留水に溶解した。これに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液 (660mM Tris-HCl, 66mM MgCl₂, pH7.6) 5 μl, 50mMのジチオスリトール5 μlおよび10mMのATP5 μlを加え全量を50 μlとし、これにT4DNAリガーゼ6uを加え、14°Cで16時間反応させた。このようにしてpMEL18とストレプトミセス・フラボビレンスSANK63684染色体DNAとの組み換えプラスミド混合物を調製した。

この組み換えプラスミド混合物から目的の組み換えプラスミドを選別するため、ML-236BNaをCS-514へ変換する能力を本来持たないかもしくは極めて低い能力しか持たない放線菌であるストレプトミセス・リビダンスSANK63086 (微研菌寄9169号) のプロトプラストに該組み換えプラスミド混合物を導入した。即ち、34%蔗糖を含有するGGCV培地で28°Cで3日間培養したストレプトミセス・リビダンスSANK63086の菌糸体を含む培養液を種とし、新鮮な34%蔗糖を含有するGGCV培地100ml (500ml溶坂口フラスコ) に5%量接種し28°Cで24時間往復振盪培養した。該培養液から低速遠心で菌糸体のペレットを得、これを20mlのP培地 (320mM蔗糖, 25mM TES緩衝液, 70mM NaCl, 10mM MgCl₂, 6H₂O, 20mM CaCl₂ · 2H₂O) に懸濁し洗浄した。次いで遠心し得られた菌糸体を20mlのP培地に懸濁した。この菌糸体懸濁液に40mg/ml濃度のリゾチーム溶液1mlを加え、28°Cで1時間加温するとストレプトミセス・リビダンスSANK63086株のプロトプラストが生成した。このプロトプラストと未溶解の菌糸体の混合物をグラスフィルター (3G3) にて自然ろ過しプロトプラストを多量に含有したプロトプラスト液を得た。これを低速遠心しペレットを再びP培地に懸濁した。この操作を3回繰返し十分洗浄することにより所望のプロトプラスト数を含有するプロトプラスト液を調製した。

得られたプロトプラスト液を遠心してペレットを得た。これに先に得られている組み換えプラスミド混合物を加えおだやかに攪拌しプロトプラストを均一に分散させた。これに20%ポリエチレンギリコール1540を含むP培地0.5mlを加え1分間静置した後、更に4mlのP培地を加えた。この形質転換操作はすべて0°Cで行なわれた。形質転換後、遠心してプロトプラストペレットを得た。これに5mlのP培地を加え十分攪拌・洗浄し遠心した。この操作は少なくとも3回行ない所望量のP培地に形質転換済のプロトプラストを懸濁し再生培地 (R₂MP寒天平板) 上に塗抹した。

R₂MP培地 (蔗糖120g, K₂SO₄0.25g, K₂HPO₄0.05g, MgCl₂ · 6H₂O10.12g, CaCl₂ · 2H₂O2.95g, グルコース4g, カザミノ酸0.1g, L-プロリン3g, DL-ノルロイシン0.05g, チロシン0.5g, 酵母エキス2g, 麦芽エキス5g, 250mM TES緩衝液 (pH7.2) 100ml, 微量金属塩溶液2ml, 寒天20gを加え1000mlとする) はメラニン様色素の産生を強調するために調製した培地である。R₂MP寒天平板上に塗抹後、28°Cで20時間培養したR₂MP寒天平板上に最終濃度50 μg/mlとなるようにチオベプチニンを加えた軟寒天R₃培地 (蔗糖120g, K₂HPO₄0.2g, MgCl₂ · 6H₂O8.1g, CaCl₂ · 2H₂O2.2g, 250mM TES緩衝液 (pH7.2) 100ml, グルコース10g, 酵母エキス4g, ポリペプトン4g, KC10.5g, 寒天5gを加え1000mlとする) を3ml重層した。重層後、該寒天平板を28°Cで培養を継続するとチオベプチニンに耐性を示す形質転換株の生育がみられた。これらのチオベプチニン耐性株の中でメラニン

を產生しない株 (Me⁺株) が組み換えプラスミドを持っている形質転換株であるので、Me⁺株を選別した。

実施例2. ML-236BNaの6 β 位を水酸化しCS-514へ変換する能力を有する形質転換株のスクリーニング

一次スクリーニングは次の通り実施した。即ち、Me⁺を示す選別された形質転換株を最終濃度300 μ g/mlのML-236BNaを添加したGPY寒天平板（2%グルコース、1%ポリペプトン、0.1%酵母エキス、2%寒天、pH7.0）に移植し、28°Cで7~10日間培養しコロニーを十分生育させた。これらのコロニーをトロツカーで打抜き、直径1.5mmの寒天プラグを作製した。このようにして各々のコロニーを打抜き作製した寒天プラグ10個を1つの集団として15ml容マイクロチューブに入れ、20%エタノール200 μ lを加えよく攪拌、抽出した。次いで15,000rpmで5分間遠心分離した上清をHPLCにかけ、CS-514に由来するピークの存在の有無を判別し一次スクリーニングとした。HPLCはカラムとしてラジアルパソクC₁₈を用い移動相として25%アセトニトリルおよび0.1%トリエチルアミン（pH3.2；リン酸によって調製した）の混合溶剤を用い、流速は2ml/分で行なつた。

二次スクリーニングは、一次スクリーニングでCS-514に由来するピークの存在が認められた集団に含まれる10個のコロニーから夫々をチオペプチン25 μ g/mlを含有するGPY液体培地に接種し28°Cで3日間振盪培養した。次いでML-236BNaを300 μ g/ml濃度になるよう添加し、さらに28°Cで2~3日間振盪培養を継続した。該培養液を1.5ml容マイクロチューブに採取し、15,000rpmで5分間遠心分離して上清を採取しHPLCにかけ、ML-236BNaの6 β 位を水酸化しCS-514に変換しているクローンを選別した。HPLCの条件は一次スクリーニングと同じであるが状況に応じて移動相を30%アセトニトリルおよび0.1%トリエチルアミン（pH3.2；リン酸によって調製した）の混合溶剤、流速を1ml/分に変えて行なつた。

実施例3. ML-236BNaの6 β 位を水酸化しCS-514へ変換する能力を有する形質転換株ストレプトミセス・リビダンスMLR-1528No.416株の培養とプラスミドpHY01の調製およびストレプトミセス・リビダンスの再形質転換

実施例2に記載されたスクリーニング方法によつて、ML-236BNaの6 β 位を水酸化し、CS-514へ変換する能力を付与された形質転換株ストレプトミセス・リビダンスMLR-1528No.416株が選択された。これは、この株が特定のプラスミド（プラスミドpHY01）を含有しているためにML-236BNaをCS-514へ変換できるようになつたものと考えられる。このプラスミドpHY01を調製し、ストレプトミセス・リビダンスを再形質転換してその確認を行なつた。

即ち、34%蔗糖を含有するGGCV培地20mlを50ml容枝つきフラスコに入れ、これにMLR-1528No.416株の菌糸体を接種後、24~28°Cで約72時間、120rpmの往復振盪機上で培養した。次いで500ml容坂口フラスコに入つた、34

%蔗糖を含有するGGCV培地100mlに上記種培養の懸濁液を培地の1~5%相当量を接種し、24~28°Cで24~48時間往復振盪機上で培養した。

この培養液から低速遠心（例えば10,000g, 4°C, 20分）で菌糸体を集菌し、上澄液を傾斜で除いて菌糸体ペレットを得た。菌糸体ペレットを20mlのTES緩衝液（25mMトリスヒドロキシメチル アミノメタン（トリス）、25mM EDTAおよび25mM食塩、pH=7.5）に再懸濁し、次いでこの再懸濁物に40mg/mlの濃度のリゾチーム溶液を1ml加え、この混合物を37°Cで5~15分緩く搅拌しながら加温し、次にこれに3mlの10%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液を加え、緩く混合したのち37°Cで5分間加温して溶菌した。

次いでこの溶菌物を40,000g, 4°C, 30分遠心することで粗製溶菌物を上澄として得、これに1/4容量の5M食塩を加えて最終食塩濃度を1Mとし、0°Cで2~3時間冷却すると先に加えたSDSが沈殿してくるので、3000g, 0°C, 15分の遠心を行ない、SDSを除いた。この上澄液にリボヌクレアーゼを加えて37°Cで20分更にプロナーゼを加えて

37°Cで20分消化を行なつた。この消化液に40%ポリエチレン glycol (PEG) 6000溶液を最終濃度10%になるよう添加し、この混合物を0°Cで1晩保つと、DNAが沈殿してくるので、緩い遠心（3000g, 0°C, 15分）後上澄を捨て、沈殿物を4.7mlのTES緩衝液に懸濁して十分に溶かし、TES緩衝液中で透析し、DNA抽出サンプルを得た。

このようにして得たDNA抽出サンプルに塩化セシウムを混合し、更に蛍光発色剤エチジウム・ブロミド（ETBr）を加え、混合して1.620の密度の溶液を調製した。この溶液は150,000g, 18°Cで40時間平衡密度勾配遠心を行ない、この遠心管に320nmの紫外線を照射すると、遠心管中で染色体由来の線状DNAの強い蛍光帯の下に、閉環状のプラスミドpHY01のDNAが蛍光帯として分離しているのが見いだせた。

閉環状のプラスミドDNAの蛍光帯部分を採取し、これを等量のn-ブチルアルコールで3回抽出してエチジウム・ブロミドを除去し、次に水層を適当な緩衝液（例えば、10mMトリス、10mM食塩および1mM EDTA, pH=7.5）で透析して純粋な組み換えプラスミドpHY01を得た。

このようにして得られた純粋な組み換えプラスミドpHY01は紫外線260nmの吸光度から濃度が求められた。

組み換えプラスミドpHY01における挿入DNA断片の大きさはアガロース・ゲル電気泳動によって算出された。即ち、組み換えプラスミド0.5 μ gを制限酵素Bcl Iで切断することによりベクタープラスミドpMEL18に挿入されているDNA断片の大きさが判別出来る。挿入DNA断片の大きさは約10kbであることが判明した。分子量マーカーとしてラムダDNAのHind III切断片または ϕ X174DNAのHae II I切断片を用い、電気泳動の移動度からBcl I消化によって生成する5つのDNA断片の大きさを測定した。これら50の総和（約15.8kb）とベクタープラスミドpMEL18の大き

さ（約5.8kb）との差を挿入DNA断片の大きさとした。

なお、このようにして得られた組み換えプラスミドpHY01（第2図参照）を用いて実施例1に記載した方法でストレプトミセス・リビダンスSANK63086（微研菌寄第9169号）を再形質転換した。この再形質転換によつて得られた形質転換株50株についてML-236BNaのCS-514への変換能について検討したところ、すべての株で変換能が認められた。またこれらの株から分離されたプラスミドはpHY01であつた。

実施例4 形質転換株MLR-1528No.416からのプラスミドpHY01の除去とpHY01による形質転換

プラスミドpHY01が導入されたことによつてML-236BNaをCS-514へ変換する能力が付与された形質転換株MLR-1528No.416からアクリラビンまたはプロトプラスト再生によつてプラスミドpHY01が脱落、除去された416P-7株を取得した。この株はプラスミドpHY01の除去に伴つてチオペプチニンに感受性であつた。また、この株は実施例2に記載された二次スクリーニングと同じ方法によつてCS-514への変換能の有無を調べたところ、変換活性は認められなかつた。さらにこの株について先に述べた無細胞抽出液を用いてCO差スペクトルを測定したところ450nm付近の極大吸収が消失していた。一方、対照株のプラスミドpHY01を保持したMLR-1528No.416株においては変換活性およびCO差スペクトルにおける450nm付近の極大吸収が認められた。

次いでプラスミドpHY01を用いてこのプラスミド除去株416P-7を実施例1に記載した方法で形質転換した。この形質転換で得られた形質転換株はチオペプチニンに耐性となつており、また実施例2に記載された二次スクリーニングと同じ方法によつてCS-514への変換活性を調べたところ変換活性は復帰していた。さらにCO差スペクトルを測定したところ450nm付近の極大吸収もまた復帰していた。このことはML-236BNaの6β位を水酸化しCS-514へ変換する変換酵素、即ち水酸化酵素はチトクロームP-450である可能性を示し、かつこのチトクロームP-450遺伝子はプラスミドpHY01の挿入DNA断片中に存在していることを示すものである。

実施例5. プラスミドpHY02を単独に含む形質転換株の造成とML-236BNaからCS-514への形質転換能

実施例3に記載したようにプラスミドpHY01によつて再形質転換して得られた形質転換株50株にはすべてプラスミドpHY01が存在していることが確認されたが、これらのうちの1株がプラスミドpHY01を含むほぼ同じ大きさの2種類のプラスミドを含有しているプラスミドの混合物であることがSac Iの消化によつて生成するDNA断片の解析から判明した。

即ち、pHY01はSac I消化によつて約10kbおよび約5.8kbのDNA断片を生成するが、該混合物はSac I消化によつてプラスミドpHY01に由来する約10kbと約5.8kbのDNA断片以外にpHY02と命名したプラスミドに由来する約13.1k

bと約2.4kbのDNA断片を生成していた。そこでプラスミドpHY02を分離するために該混合物を用いて実施例1に記載した方法によつて形質転換を実施し、生育した形質転換株から実施例3に記載した方法でプラスミドを調製した。次いで該プラスミドをSac Iで消化することによつて約13.1kbと約2.4kbのDNA断片を生ずるものを選択して、プラスミドpHY02を単独に含む形質転換株が得られた。プラスミドpHY02を単独に含む形質転換株のML-236BNaからCS-514への形質転換能は実施例2に記載した二次スクリーニングの方法によつて測定し、形質転換能を保持していることを確認した。

実施例6. プラスミドpHY02の調製

プラスミドpHY02はその制限酵素切断地図から、水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含む約10kbの挿入DNA断片において宿主菌体内において少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7kbを含む約7.1kbのDNA断片が組み換えをうけプラスミドpHY01の挿入DNA断片における当該部分との相同域が逆向きに配位されたものであつた（第3図参照）。このように少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7kbを含む約7.1kbのDNA断片が逆向きに配位されたにも拘わらずML-236BNaがCS-514への変換を受けたことは、ML-236BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子がこの約7.1kbのDNA断片内に位置していることを示している。このことは、プラスミドpHY02のSac I消化によつて生ずる約2.4kbのDNA断片は水酸化酵素活性の発現には不要であることを示す。従つてこの約2.4kbのDNA断片を除去することが可能である。この約2.4kbDNA断片を除去した小型化プラスミドpHY02の調製は以下の通りに行なわれた。

プラスミドpHY02の1μgを5uのSac Iを用いて37°Cで2時間消化した。次いで70°Cにて10分間加熱しSac Iを失活させた後、エタノール沈殿を行なつた。次いでこのSac I消化エタノール沈殿物を乾燥後、35μlの蒸留水に溶解し、これに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液5μl, 50mM、ジチオスリトール5μlおよび10mM ATP5μlを加え全量を50μlとした。これにT4DNAリガーゼ2uを加え、14°Cで16時間反応させた。このようにしてプラスミドpHY02のSac I消化DNA断片をセルフライゲーションし、これを実施例3に記載したプラスミドpHY01の除去株（416P-7株）のプロトプラストへ実施例1に記載した方法によつて導入し、Thiorを示す形質転換株を得た。次いでこれらの形質転換株から実施例3に記載された方法によつてプラスミドを抽出し約2.4kbDNA断片を失ったプラスミド、即ち約13.1kbの大きさを有するプラスミドを選択した。このようにして得られたプラスミドはSac I切断部位を1ヶ所持つ約13.1kbのプラスミドpHY02 1（第4図参照）である。このプラスミドはpHY02と同じようにML-236BNaの6β位を水酸化しCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子

を含有する、少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7kb部分を含む約7.1kbのDNA断片を持っており、プラスミドpHY01およびpHY02と同じく宿主細胞にML-236BNaからCS-514へ変換する能力を付与する。

実施例7. プラスミドpHY022の調製

プラスミドpHY021の5 μgを15uのSph Iを用いて37°Cで2時間消化した。次いで70°Cに10分間加熱しSph Iを失活させた後、0.8%アガロース・ゲル電気泳動にかけた。アガロース・ゲル電気泳動では約11.6kbと約1.5kbのDNA断片が生成しており、このうち約11.6kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気溶出法によって該DNA断片を溶出した。溶出液35 μlに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液5 μl, 50mMジチオスリトール5 μl、および10mM ATP5 μlを加え全量を50 μlとし、これにT4DNAリガーゼ2uを加え14°Cで16時間反応させた。このようにしてプラスミドpHY021のSph I消化によって生ずる約11.6kbのDNA断片をセルフライゲーションし、これを実施例3に記載した416P-7株のプロトプラストへ実施例1に記載した方法によって導入し、Thio^rを示す形質転換株を得た。次いでこの形質転換株から実施例3に記載された方法によってプラスミドを抽出した。このようにして得られたプラスミドはSph I切断部位を1ヶ所持つ約11.6kbのプラスミドpHY022(第5図参照)である。このプラスミドはpHY021の持つ約7.1kbの挿入DNA断片からSph I消化によって生成する約1.5kbが除かれた約5.6kbの挿入DNA断片を持っているが、宿主細胞(416P-7株)にML-236BNaからCS-514へ変換する能力を付与し得ない。

実施例8. プラスミドpHY023の調製

プラスミドpHY021の5 μgを15uのMlu Iを用いて37°Cで2時間消化した。次いで70°Cに10分間加熱しMlu Iを失活させた後、0.8%アガロース・ゲル電気泳動にかけた。アガロース・ゲル電気泳動では約8.6kb、約3.6kb(ベクターDNA断片の約0.3kbを含む)および約0.9kbのDNA断片が生成しており、このうち約8.6kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気溶出法によって該DNA断片を溶出した。この溶出液35 μlに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液5 μl, 50mMジチオスリトール5 μlおよび10mM ATP5 μlを加え全量を50 μlとしこれにT4DNAリガーゼ2uを加え14°Cで16時間反応させた。このようにしてプラスミドpHY021のMlu I消化によって生ずる約8.6kbのDNA断片をセルフライゲーションし、これを実施例3に記載した416P-7株のプロトプラストへ実施例1に記載された方法によって導入しThio^rを示す形質転換株を得た。次いでこの形質転換株から実施例3に記載された方法によってプラスミドを抽出した。このようにして得られたプラスミドはMlu I部位を1ヶ所持つ約8.6kbのプラスミドpHY023(第6図参照)である。このプラスミドはpHY021の持つ約7.1kbの挿入DNA断片からMlu I消化によって生成する約0.9kbおよびベクターDNA断片の約0.3kbを含む約3.6kbが除かれた約2.9kbの挿入DNA断片を持ち、宿

主細胞(416P-7株)にML-236BNaからCS-514へ変換する能力を付与する。しかしその能力はpHY021によって付与される能力に比べると約1/3程度である。

試験例1.

(1) ストレプトミセス・リビダンスSANK63086へのML-236BNaをCS-514へ変換する能力の付与

それぞれ次の菌株

(a) ストレプトミセス・リビダンスSANK63086(微工研菌寄第9169号)；

(b) ベクタープラスミドpMEL18を含むストレプトミセス・リビダンスSANK63086であるストレプトミセス・リビダンスSANK60587(微工研菌寄第9168号)；

(c) ストレプトミセス・リビダンスSANK63086株の本発明によるML-236BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含むDNAを含有する組み換えプラスミドpHY01による形質転換株であるMLR-1528・N0416株；

(d) MLR-1528・N0416株からプラスミドpHY01を除去した株である416P-7株；

(e) 416P-7株のプラスミドpHY01による再形質転換株であるRTF-85株；

(f) 416P-7株のプラスミドpHY021による再形質転換株であるRTF-182株；

これらのうち(a)のストレプトミセス・リビダンスSANK63086株と(d)の416P-7株はGPY培地に接種し、

(b) のストレプトミセス・リビダンスSANK60587株、

(c) のMLR-1528N.0.416株、(e) のRTF-85株および(f) のRTF-182株はチオペプチド25 μg/mlを含むGPy培地に接種し、28°C 3日間振盪培養した。次いで、これを種として新鮮なGPy培地にこれを5%量接種した。次

いで、28°Cで1日振盪培養した培養液にML-236BNaを500 μg/ml濃度になるように添加し更に28°Cで3日間振盪培養した。次いで1.5ml容マイクロチューブに各培養液を採取し15,000rpmで5分間遠心分離した後、上清を採取しHPLCによって生成したCS-514を測定した。

CS-514の生成量は(a)は1 μg/ml、(b)は5 μg/ml、(c)は359 μg/ml、(d)は1 μg/ml、(e)は340 μg/ml、(f)は390 μg/mlであった。このことはプラスミドpHY01およびプラスミドpHY021が本来ML-236BN

aの6 β位を水酸化しCS-514へ変換する能力を持たないか、もしくは極めて低い能力しか持たない宿主、ストレプトミセス・リビダンスSANK63086株にML-236BNaからCS-514へ変換する能力を付与していることを示すものである。

試験例2. プラスミドpHY01及びプラスミドpHY021保持株の水酸化酵素活性測定とチトクロームP-450の測定

プラスミドpHY01及びプラスミドpHY021によるストレプトミセス・リビダンスの形質転換株(MLR1528No.416, RTF-85およびRTF-182)対照株としてストレプトミセス・リビダンスSANK63086およびストレプトミセス・リ

ビダンスSANK60587等の「ML-236BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性の測定」と「チトクロームP-450の測定」のための無細胞抽出液の調製法は次のように行なつた。GTY培地で前培養した菌株を新鮮なGTY培地100ml(500ml容三角フラスコに入つたもの)に5%量接種し28℃で24時間回転振盪培養した。

ML-236BNaを500μg/mlになるよう添加し、さらに28℃で24時間回転振盪培養を継続した。培養液を0℃で5,000×gにて15分間遠心分離して集菌した。氷中で冷却した0.85%食塩水で3回洗浄後、湿菌体重量の倍量の冷20% (v/v) グリセロール、2mMジチオスリトールを含む80mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4、以下「A緩衝液」という)を加え、氷冷下超音波破碎した。次いで20,000×gで30分間遠心分離し、上清を採取し無細胞抽出液とした。

ML-236BNaからCS-514への水酸化酵素活性測定法は各株の無細胞抽出液を次の条件(反応液組成)

無細胞抽出液	0.8ml			
NADPH再生系				
NADP	0.26ml			
グルコース・6-リン酸	14mM	20		
グルコース・6-リン酸脱水素酵素	0.5μ			
ニコチン酸アミド	10mM			
塩化マグネシウム	2.5mM*			

* フエレドキシン・NADP+一還元酵素 (ホウレン草)	0.025μ
フエレドキシン(クロストリジウム・ハストイリアヌム)	5 μg
ホフアチジルコリン	2mg
硫酸第1鉄	1mM
ML-236BNa(基質)	2.33mM
最終容量	1ml
10 50μlを添加しpHを調整したのち、HPLC(カラム: ウォーターズラジアルパックカートリッジC ₁₈ , 溶出条件: 27%アセトニトリル/0.1%H ₃ PO ₄ , TEA (pH3.2))にて生成したCS-514を測定した。酵素活性は酵素液1mlあたり1時間でCS-514が1μg/ml生成する場合を1ユニットと定めた。	で30℃ 1時間振盪しながら反応させた。次いで6N-NaOH
チトクロームP-450はOmuraらの方法(J.Biol.Chem., 239, 2370, (1964))に従い還元型Co差スペクトルにより同定した。またチトクロームP-450は下式に従つて定量した。	チトクロームP-450 (nmol/ml) = (O.D450-O.D490) × 1000/91
チトクロームP-450 (nmol/ml) = (O.D450-O.D490) × 1000/91	結果を第1表に示す。

第 1 表

菌株	プラスミド	蛋白 ¹⁾ mg/ml	変換酵素活性 u/mg蛋白	チトクロームP-450 nmol/ml(nmol/mg蛋白)
ストレプトミセス・リビダンス SANK63086	None	12.3	ND ²⁾	ND(ND)
ストレプトミセス・リビダンス SANK60587	pHY18(ベクター)	13.9	ND	ND(ND)
MLR-1528 No.416	pHY01	14.0	4.88	1,495(0.107)
416P-7(プラスミド除去株)	None	9.8	ND	ND(ND)
RTF-85	pHY01	7.3	6.54	0.501(0.068)
RTF-182	pHY021	6.6	5.34	0.473(0.072)

注 1) 蛋白濃度はLowry法(J.Biol.Chem., 183, 265, (1951))により、牛血清アルブミンを標品として測定した。

2) ND: 検出されず

第1表より、ML-236BNaのCS-514への変換酵素活性は宿主(ストレプトミセス・リビダンスSANK63086)及びベクタープラスミドによる形質転換株(ストレプトミセス・リビダンスSANK60587)では検出されないがプラスミドpHY01による形質転換株では変換酵素活性が出現し、同時にチトクロームP-450の产生も認められる。プラスミド除去株では変換酵素活性と共にチトクロームP-450の产生は認められなくなり、該菌株をプラスミドpHY01またはプラスミドpHY021によって形質転換することによって変換酵素活性が再び出現し、同時にチトクロームP-450も产生されるようになる。

挿入方向の異なるDNA断片を有するプラスミドpHY01,p

HY021がともに、本来ML-236BNaをCS-514へ変換する能力を持たないか、または持つても極めて低い能力の宿主であるストレプトミセス・リビダンスSANK63086またはストレプトミセス・リビダンス416P-7に、該変換能と同時にチトクロームP-450の產生能をも付与することは、これらの組み換えDNAに含有される挿入DNA断片に水酸化酵素活性を有するP-450遺伝子がプロモーター領域を持ってクローナ化されたことを示す。

試験例3 チトクロームP-450遺伝子の局在領域の検討

プラスミドpHY021,pHY022及びpHY023によるストレプトミセス・リビダンス416P-7の形質転換株(RTF-25

8,RTF-286及びRTF-288)、対照株としてストレプトミセス・リビダンスSANK60587等の「ML-236BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性の測定」と「チトクロームP-450の測定」のための無細胞抽出液の調製法、「ML-236BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性の測定」および「チトクロームP-450の測定」は試験例2に従って行なった。

第7図よりチトクロームP-450生産には少なくともSph I消化によって生じる約1.5kbのSph I断片を含むBgl II/Mbo Iのベクターと挿入DNA断片の連結部位からMlu I切断部位までの約2.9kbのDNA断片が必要であることが示される。即ちチトクロームP-450遺伝子はプラスミドpHY023の挿入DNA断片とBgl II/Mbo Iの連結部位からMlu I切断部位までの約2.9kbに存在していることになる。しかしながら宿主にML-236BNaからCS-514への十分な変換活性を付与するためにはpHY021の持つ挿入DNA断片約7.1kbが必要であると考えられる。

参考例 プラスミドpMEL18の構築と調製方法

プラスミドPIJ702 (Katz et al., J.Gen.Microbiol., 129, 2703 (1983)) 上に存在するチロシナーゼ遺伝子 (mel gene) はすべてのストレプトミセスで発現されるものではない。そこで該mel geneを発現し得ないストレプトミセスにおいてもメラニン産生を指標としてクローニング出来るよう設計されたプラスミドpMEL18を構築した。PIJ702のmel geneを発現し得ない宿主 [16] - 8 · SANK61185株 (微研条寄第1140号 (FERM BP-1140)) を用いた。PIJ702のmel geneを発現し得ない宿主 [16] - 8 · SANK61185株に、該mel geneを発現させ得る能力を付与するDNA断片は全てのストレプトミセスの染色体DNAから分離することが可能であるが、ここではストレプトミセス・エス・ピー-SANK61184の培養菌糸体からMarmur法 (J.Mol.Biol., 3, 208 (1961)) によって抽出したDNAを外来性DNAとして供試した。

ストレプトミセス・エス・ピー-SANK61184のDNA $5\mu g$ とプラスミドPIJ702の $1\mu g$ を混合し、次いで4倍濃度の制限酵素反応液1/3容量および制限酵素Sph I 9uを加えた。DNAを完全に切断するため37°Cで2時間培養した後、70°Cで10分間加熱し制限酵素を失活させた。この試料に1/10容量の3M酢酸ナトリウムを加え攪拌し、次いで25倍量の-20°Cで冷却したエタノールを加えた後、-70°Cで10~20分間冷却した。この試料を微量遠心機にて遠心し上清を捨てDNA沈殿を-20°Cのエタノールで洗浄した。次いで真空中で乾燥し滅菌蒸留水にて溶解後、10倍濃度に調製したりガーゼ反応液 (660mMトリス・HCl, 66mM MgCl₂ · H₂O, 100mM DTT, 1.1mM ATP, pH7.6) を1/9容量加えた。さらにこれにT₄DNAリガーゼを加え、14°Cで16時間インキュベート後、65°Cで10分間加熱しリガーゼを失活させた。これを形質転換用試料として用いた。該形

質転換用試料を用いての [16] - 8 · SANK61185株の形質転換は次の通りに行なつた。即ち、50ml容枝つきフラスコにGGCY培地20mlを入れこれに [16] - 8 · SANK61185株の菌糸体を接種後、24~28°Cで72時間、120rpmの往復振盪機上で培養した。これを種としGGCY培地100mlが入つた500ml容坂口フラスコに5%量接種し24~28°Cで24時間往復振盪機上で培養した。この培養液から低速遠心で菌糸体のペレットを得、これを20mlのP培地 (320mM蔗糖、25mM TES緩衝液、70mM食塩、10mM MgCl₂、20mM CaCl₂) に懸濁し洗浄後、遠心し得られた菌体ペレットを再び20mlのP培地に懸濁した。この菌体懸濁液に40mg/ml濃度のリゾチーム溶液を1ml加え、28°Cで1時間加温して [16] - 8 · SANK61185株のプロトプラストが生成した。プロトプラストと未溶解の菌糸体の混合物は、これをグラスフィルター (3G3) にて自然ろ過しプロトプラストを多量に含有したプロトプラスト液を得、これを低速遠心しペレットを再びP培地に懸濁した。この操作を3回繰返し十分洗浄することにより所望のプロトプラスト数を含有するプロトプラスト液を調製した。

形質転換は、先に調製した形質転換用試料を用いて、実施例1に記載した方法によって行なつた。形質転換操作を終了したプロトプラストを適宜懸濁しR₂MP再生培地 (培地組成は実施例1に記載) 上に塗抹した。R₂MP寒天板上に塗抹後、28°Cで20時間培養したR₂MP寒天平板上に最終濃度50μg/mlとなるようにチオペプチドを加えた軟寒天R₃培地 (培地組成は実施例1に記載) を3ml重層した。重層後、該寒天平板を28°Cで培養を継続するとチオペプチドに耐性を示す300の形質転換株の生育がみられた。その中でメラニン色素を産生する株が7株認められた。これらの株から分離したプラスミドは130から1540ベース・ペア (bp) のDNA断片を保持しており、それぞれpMEL18からpMEL24までに命名された。なおこれらのプラスミドpMEL18からpMEL24までが宿主の [16] - 8 · SANK61185株にメラニン色素産生を付与することは再形質転換によって確認された。

これらの7つのプラスミドのうちpMEL18は130bpのDNA断片をもち、且つこの130bpの断片中にはBgl IIもしくはSac Iの制限酵素認識部位が認められることから、この部位を用いたクローニングベクターとして、PIJ702を用いることの出来ない宿主にも使用出来る。純粋なプラスミドpMEL18の抽出、精製のための培養は、pMEL18を保持する形質転換体 (MEL18株) を用いて以下の通り行なわれた。

培地組成がグルコース0.4%、麦芽エキス1.0%及び酵母エキス0.4%であつてチオペプチドを25μg/mlになるよう添加した培地20mlを50ml容枝つきフラスコに入れ、これにMEL18株の菌糸体を接種後、24~28°Cで約72時間120rpmの往復振盪機上で培養した。次に菌糸体回収用培地組成がグリセロール0.4%、カザミノ酸0.4%、酵母エキス0.05%、麦芽エキス0.1%、MgSO₄0.1%、CaCl₂ · 2H

200.01%、KH₂PO₄ 0.2%及びNa₂HPO₄ · 12H₂O 0.8% (pH 7.2に調整) であつて、チオペプチンを25 μg/mlになるよう添加した培地100mlを500ml容坂口フラスコに入れこれに上記種培養の懸濁液を培地の1~5%相当量を接種し、24~28°Cで24~48時間往復振盪機上で培養した。

この培養液から低速遠心（例えば10,000g、4℃、20分）で菌糸体を集菌し、上澄液を傾斜で除いて菌糸体ペレットを得た。プラスミドpMEL18の抽出精製は、該菌糸体ペレットを再懸濁したものより実施例3に記載した方法に基ずいて行ない純粋なプラスミドpMEL18を得た。

組み換えプラスミドにおける挿入DNA断片の大きさはアガロース・ゲル電気泳動によって算出された。即ち、組み換えプラスミド $0.5\mu\text{g}$ を制限酵素Sph Iで切断することにより、ベクタープラスミドとして用いたPIJ702の線状化した5.8キロベースの断片と130bpの挿入DNA断片の2本のバンドが生成した。分子量マーカーとしてランダムDNAのHind III切断断片または ϕ X174DNAのHae III切断断片を用い、挿入DNA断片の大きさによってアガロース・ゲルの濃度を0.8%, 1.2%, 2%と換えて電気泳動し分子量マーカーの移動度から挿入DNA断片の大きさを測定した。

このようにして得られたプラスミドpMEL18はストレプトミセス・リビダンスSANK63086に導入し、ストレプトミセス・リビダンスSANK60587として寄託されている（微工研菌寄第9168号）。

(図面の簡単な説明)

第1図はML-236BNaの6 β 位を水酸化しCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450の遺伝子を含有する約7.1kbのDNA断片の制限酵素切断地図である。

図中、SalはSac I, KpnはKpn I, PはPst I, MluはMlu I, SphはSph I, XbaはXba I, EcoはEcoR IおよびBclはBcl Iによる切断点を示す。数字は各制限酵素切開位置間の距離を示しKbで表わしている。

第2図は組み換えプラスミドpHY01の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド（細線で表わされている）として用いたpMEL18に存在するBamH I切断点を座

標点とした場合の各制限酵素切断位置を表わしている。斜線部分はプラスミドpHY02およびプラスミドpHY021の挿入DNA断片との相同領域を表わしている。

第3図は組み換えプラスミドpHY02の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド（細線で表わされている）に由来するDNA断片上のBamH I切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。斜線部分はプラスミドpHY01の挿入DNA断片との相同領域を表わしている。

10. 第4図は組み換えプラスミドpHY021の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド（細線で表わされている）に由来するDNA断片上のBamH I切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHY02のSac I消化で生じる約2.4KbのDNA断片を除去したものである。斜線部分はプラスミドpHY02の斜線部分と同一である。

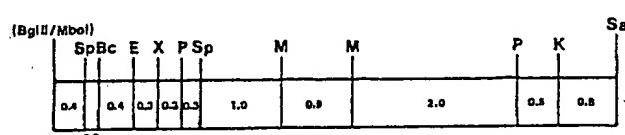
第5図は組み換えプラスミドpHY022の制限酵素切断部位である。数字はベクタープラスミド（細線で表わされている）に由来するDNA断片上のBamH I切断点を座標点として

した場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHY021のSph I消化で生じる約1.5 KbのDNA断片を除去したものである。

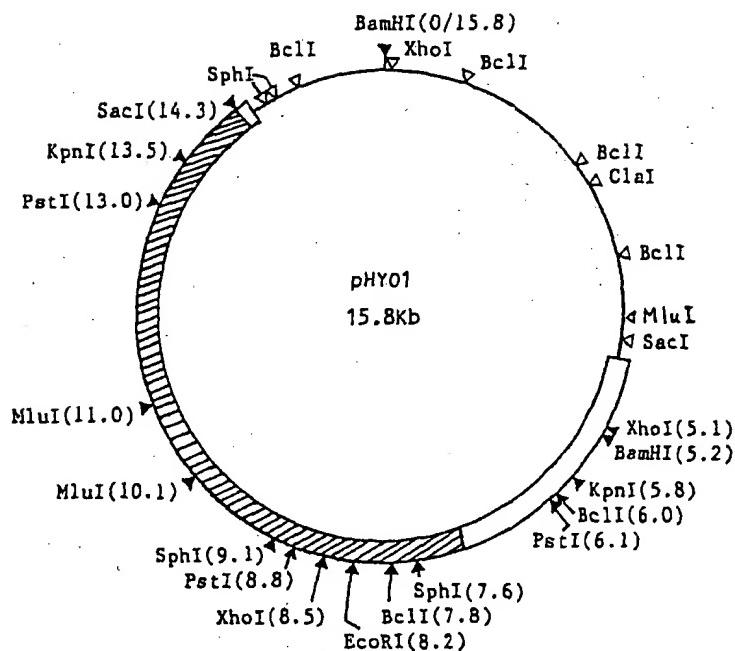
第6図は組み4換えプラスミドpHY023の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド（細線で表わされている）に由来するDNA断片上のBamH I切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHY021のMlu I消化で生じる約3.6Kbと約0.9KbのDNA断片を除去したものである。

30 第7図はプラスミドpHY021の持つ挿入DNA断片約7.1KbにおけるチトクロームP-450遺伝子の局在部位の検討結果を示したものである。各プラスミドによって形質転換された宿主、ストレプトミセス・リビダンスにおける変換酵素活性とチトクロームP-450産生との関係が示されている。図中、黒線はベクターDNA断片、白線は挿入DNA断片を表わし、点線は除去されたDNA断片の領域を表わしている。

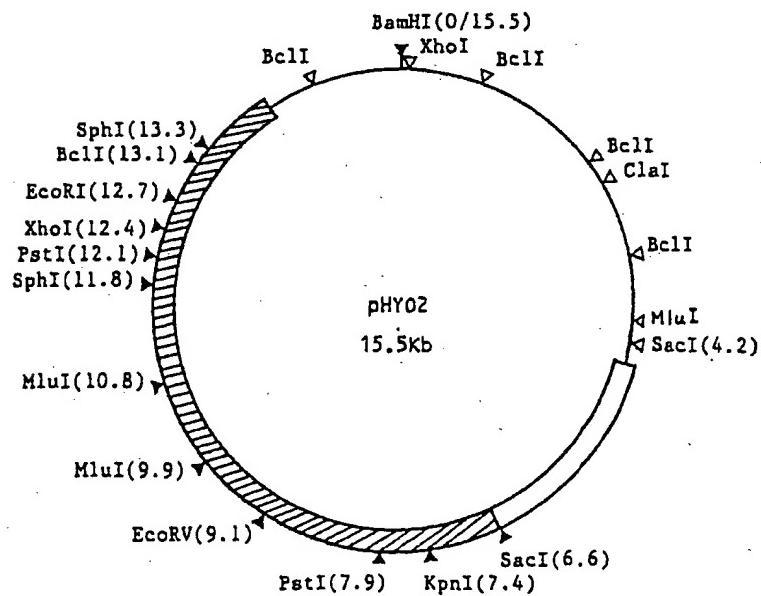
[第1回]



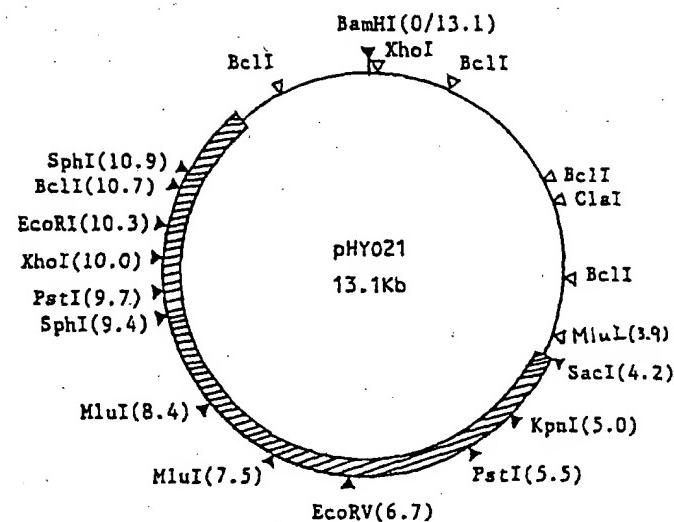
[第2図]



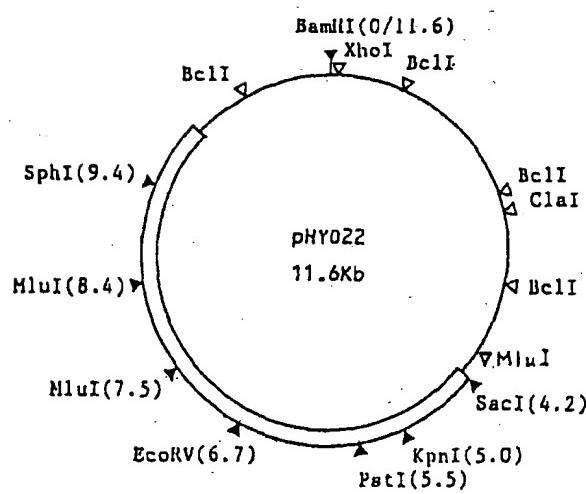
[第3図]



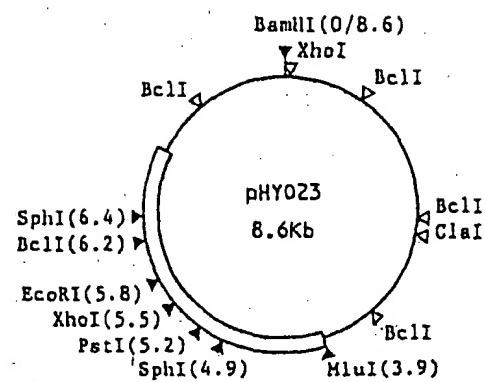
【第4図】



【第5図】

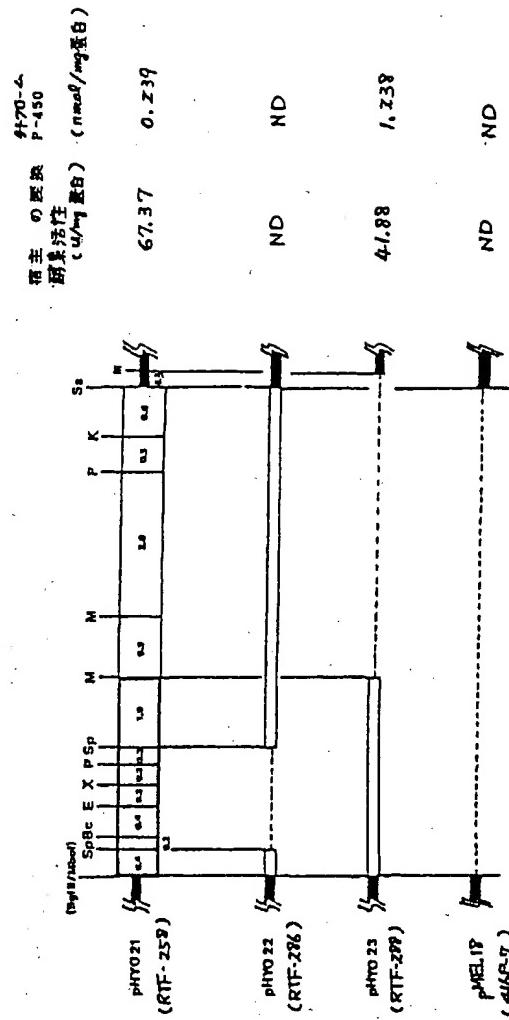


[第6図]



[第7図]

チトプロ-4 P-450 遺伝子の局在部位の検討



フロントページの続き

(51) Int.Cl.6

C12R 1:465)

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所